

IPW

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of

GARACI et al.

Serial No. 10/533,942

Filed: May 4, 2005



Atty. Ref.: ARC-4865-45

TC/A.U.: 4161

Examiner: Zarek

For: USE OF RESVERATROL FOR THE PREPARATION OF A
MEDICAMENT USEFUL FOR THE TREATMENT OF
INFLUENZA VIRUS INFECTIONS

* * * * *

October 15, 2008

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENTS


It is respectfully requested that this application be given the benefit of the foreign filing date under the provisions of 35 U.S.C. §119 of the following, a certified copy of which is submitted herewith:

<u>Application No.</u>	<u>Country of Origin</u>	<u>Filed</u>
RM 2002 A 000562	Italy	6 November 2002

Respectfully submitted,

NIXON & VANDERHYE P.C.

By: _____


Arthur R. Crawford
Reg. No. 25,327

ARC:eaw
901 North Glebe Road, 11th Floor
Arlington, VA 22203-1808
Telephone: (703) 816-4000
Facsimile: (703) 816-4100



Ministero dello Sviluppo Economico

DIPARTIMENTO PER LA REGOLAZIONE DEL MERCATO
DIREZIONE GENERALE PROPRIETA' INDUSTRIALE
Ufficio Italiano Brevetti e Marchi – Ufficio 2

Autenticazione di copia di documenti relativi al brevetto per:
Invenzione Industriale n. 1333459 rilasciato il 12.04.2006
(domanda n. RM 2002 A 000562)

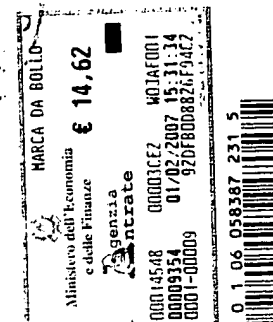
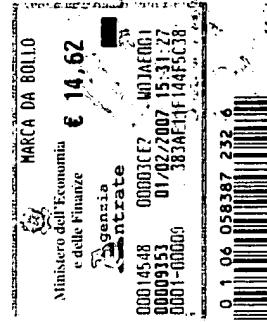
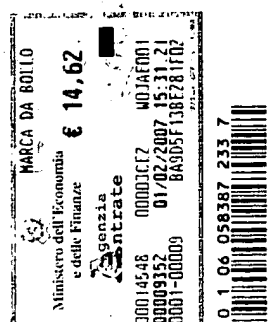
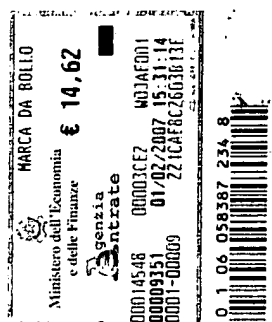
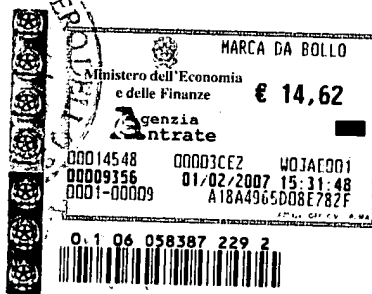
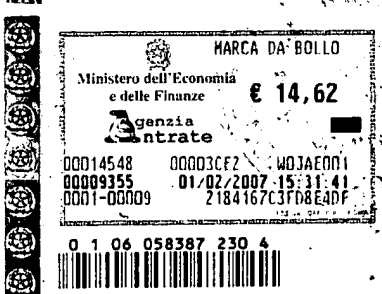
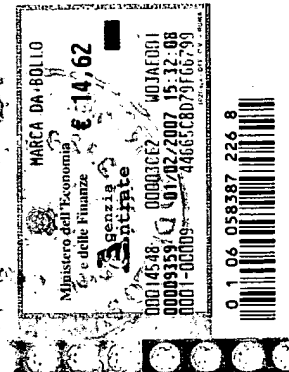
Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
conservati dall'ufficio.

Si compone di pagg. 35

Roma, li. 26 SET 2009

IL FUNZIONARIO

Elena Marinelli
ELENA MARINELLI



AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

MODULO A

marca
da
bollo

A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione SIGMA-TAU Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A.

Residenza Roma (RM)

codice

2) Denominazione

Residenza

codice

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome Dott. Marco Spadaro ed altri

cod. fiscale

denominazione studio di appartenenza Studio Associato CAVATTONI - RAIMONDI

via le dei Parioli

n.

160

città

Roma

cap

00197

(prov)

RM

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via

n.

città

cap

(prov)

D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/sci)

gruppo/sottogruppo

"Uso del resveratrolo per la preparazione di un medicamento utile per il trattamento delle infezioni da virus dell'influenza"

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA

N° PROTOCOLLO

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) Enrico GARACI

3)

2) Anna Teresa PALAMARA

4)

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato
S/R

1) nessuna

2)

SCIOGLIMENTO RISERVE

Data

N° Protocollo

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) 2 PROV n. pag. 24 riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)

Doc. 2) 2 PROV n. tav. 09 disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)

Doc. 3) 1 RIS lettera d'incarico, procura e riferimento procura generale

Doc. 4) 0 RIS designazione inventore

Doc. 5) 0 RIS documenti di priorità con traduzione in italiano

Doc. 6) 0 RIS autorizzazione o atto di cessione

Doc. 7) 0 nominativo completo del richiedente

8) attestati di versamento, totale

euro Duecentonovantuno/80.-

obbligatorio

COMPILATO IL 06/11/2002

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE (I)

Marco SPADARO

CONTINUA SI/NO NO

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO SI

CAMERA DI COMMERCIO, INDUSTRIA, ARTIGIANATO E AGRICOLTURA - ROMA codice 58

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

RM 2002 A 000562

L'anno

duemiladue

il giorno

sei

del mese di

novembre

il(i) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. 001 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto soprariportato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

DEPOSITANTE

L'UFFICIALE ROGANTE
Ufficiale Rogante
Sime Albert

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA

NUMERO BREVETTO

REG. A

RM 2002 A 000562

DATA DI DEPOSITO

06/11/2002

DATA DI RILASCIO

/ /

D. TITOLO

"Uso del resveratrolo per la preparazione di un medicamento utile per il trattamento delle infezioni da virus dell'influenza"

L. RIASSUNTO

Si descrive l'uso del resveratrolo per la preparazione di un medicamento utile per il trattamento dell'influenza. Detto medicamento svolge la propria attività terapeutica attraverso l'inibizione della replicazione virale.

M. DISEGNO

Descrizione dell'invenzione avente per titolo **RM 2002 A 000562**

"Uso del resveratrolo per la preparazione di un medicamento utile per il trattamento delle infezioni da virus dell'influenza"

a nome: SIGMA-TAU Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A.

di nazionalità: italiana

con sede in: Viale Shakespeare, 47 - 00144 Roma RM

Inventori: Enrico GARACI

Anna Teresa PALAMARA

La presente invenzione si riferisce all'uso del resveratrolo come principio attivo nella preparazione di un medicamento utile per trattare le infezioni da virus dell'influenza.

Sfondo dell'invenzione

Il resveratrolo, ossia il 3,4,5-triidrossistilbene, è stato intensamente studiato in tempi recenti, in relazione alle note proprietà benefiche del vino rosso, delle quali è uno dei principi fondamentali (*Life Sci.*, 71, 2145-52, 2002).

Il resveratrolo è localizzato nella buccia dell'uva nera in quantità compresa tra 50 e 100 µg/grammo e la sua concentrazione nel vino rosso varia tra 1,5 e 3 mg/l.

Numerosi studi hanno dimostrato un'attività anti-carcinogena del resveratrolo, i cui meccanismi d'azione possono essere così suddivisi: inibizione dell'attivazione del fattore di trascrizione NF-κB, capace di regolare l'espressione di vari geni coinvolti nei processi infiammatori e carcinogenetici (*Lancet*, 341, 1103-1104, 1993; *Science*, 275, 218-220, 1997; *Proc. Natl. Acad. Sc.*, 94, 14138-14143, 1997; *Life Science*, 61, 2103-2110, 1997; *Brit. J. Pharm.*,

126, 673-680, 1999; *J. Imm.*, 164, 6509-6519, 2000); inibizione di diverse proteine, tra cui la proteina chinasi C (*Bioch.*, 38, 13244-13251, 1999), la ribonucleotide riduttasi, (*FEBS Lett.*, 421, 277-279, 1998) e la ciclo-ossigenasi-2 (COX-2) nelle cellule epiteliali mammarie (*Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 889, 214-223, 1999; *Carcinog.*, 21, 959-963, 2000); attivazione delle caspasi 2, 3, 6 e 9 (*FASEB J.*, 1613-1615, 2000) e modulazione del gene p53, noto soppressore tumorale (*Cancer Research*, 59, 5892-5895, 1999; *Clin. Bioch.*, 34, 415-420, 2001).

Tra le azioni benefiche del resveratrolo, va citata anche l'attività antiossidante, suggerita dalla sua capacità di contrastare gli effetti dannosi prodotti da varie sostanze e/o condizioni che provocano uno stress ossidativo intracellulare (*Free Radic. Res.*, 33, 105-114, 2000).

Il resveratrolo può indurre rilassamento vascolare tramite la produzione di ossido nitrico a livello dell'endotelio vascolare (*Cancer Res.*, 59, 2596-01, 1999, inibire la sintesi di trombossani nelle piastrine (*Clin. Chim. Acta*, 235, 207-219, 1995; *Int. J. Tissue React.*, 17, 1-3, 1995), di leucotrieni nei neutrofili e prevenire l'ossidazione e l'aggregazione delle lipoproteine a bassa densità (LDL) (*Lancet*, 341, 1103-1104, 1993; *Life Sci.*, 64, 2511-2521, 1999).

Recentemente, è stata dimostrata un'attività inibitoria del resveratrolo nei confronti del virus a DNA Herpes Simplex-1 (*Antiv. Res.*, 43, 145-155, 1999) sulla base di sistemi sperimentali in vitro.

Dati ottenuti dai presenti inventori e da altri gruppi di ricerca hanno messo in evidenza che molte sostanze antiossidanti sono in grado di inibire, in vitro, la replicazione del virus parainfluenzale 1 Sendai (SV), del virus Herpes Simplex 1 (HSV1) e del virus dell'immunodeficienza acquisita (HIV) (*AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 1997: 1537-1541; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992: 188, 1090-1096; *Antivir. Res.*, 1995, 27, 237-253). L'efficacia antivirale di sostanze antiossidanti è stata dimostrata anche in un modello murino di AIDS (MAIDS), così come nella cheratite da HSV1 (*AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 1996: 12, 1373-1381; *Exp. Eye Res.*, 200: 70, 215-220).

L'influenza rappresenta un problema epidemiologico di portata mondiale, con conseguenti gravi problemi di salute pubblica e importanti risvolti di economia sanitaria. Il virus responsabile dell'influenza è ampiamente diffuso e altamente infettivo. Purtroppo, le terapie attualmente disponibili non sono ancora pienamente efficaci e spesso portano alla selezione di ceppi virali resistenti (*Fields, cap47, 1533-79, 2001*) e inoltre le campagne di vaccinazione, oltre agli svantaggi insiti nella prevenzione vaccinale, non forniscono ancora una soddisfacente copertura per l'estrema variabilità antigenica del virus (*Fields, cap47, 1533-79, 2001*).

Tra le diverse strategie di attacco alla replicazione virale, studi recenti (*J. of Virol.*, 74, 1781-1786, 2000) hanno riportato l'importante ruolo della proteina M1 nel trasporto delle ribonu-

cleoproteine virus specifiche dal nucleo al citoplasma. Questa appare essere una tappa fondamentale del ciclo replicativo del virus, tanto che l'inibizione della replicazione virale può essere perseguita attraverso la ritenzione della nucleoproteina nel nucleo della cellula infettata dovuto alla inibita sintesi della proteina M. Tale fenomeno può essere riconducibile all'inibizione di proteine cellulari con funzione chinastica. Infatti, è stato recentemente dimostrato che l'inibizione delle chinasi provoca una ritenzione della NP nel nucleo cellulare (*Nature Cell. Biol.*, 3, 301-5, 2001; *J. of Virol.*, 74, 1781-86, 2000; insieme ad una potente attività inibitoria nei confronti della replicazione del virus influenzale.

Il GSH è conosciuto come il principale antiossidante del sistema redox cellulare ed è stato associato alla replicazione di diversi virus. Infatti, precedenti studi condotti dai presenti inventori hanno dimostrato che durante l'infezione virale è possibile osservare una diminuzione dei livelli di GSH come conseguenza dell'infezione stessa (*Rotilio e al.*, "Oxidative stress on cell activation on viral infection, 143-53, 1993; *Palamara e al.*, *Antiviral Research*, 27, 237-53, 1995).

La regolazione aberrante del noto meccanismo dell'apoptosi è alla base di numerose malattie umane, come alcune malattie neurologiche, autoimmuni, infettive (AIDS) e cancro.

In lavori precedenti, è stato descritto che il resveratrolo permette l'eliminazione di cellule tumorali attraverso l'induzione di apoptosi delle stesse. Recentemente, studi realizzati da Tinhofer I. e

al. (*FASEB J. 18, 1613-15, 2001*) hanno evidenziato che i primi eventi dell'apoptosi indotta dal resveratrolo sono caratterizzati da un'alterazione del potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\Phi_m$), dalla liberazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dall'attivazione delle caspasi 2, 3, 6 e 9. È noto anche che il virus influenzale induce apoptosi in diverse percentuali, a seconda del ceppo virale e della molteplicità d'infezione.

Riassunto dell'invenzione

È stato ora trovato che il resveratrolo ha attività di inibizione della replicazione del virus influenzale. In maniera del tutto sorprendente, è stato anche trovato che il resveratrolo esercita la sua attività di inibizione della replicazione del virus dell'influenza non attraverso l'attesa attività antiossidante, bensì attraverso un peculiare meccanismo di inibizione della protein chinasi C, un enzima cellulare che svolge un ruolo importante nel processo replicativo del virus influenzale. Il principale vantaggio rappresentato dall'uso del resveratrolo consisterebbe quindi nel colpire il virus in modo indiretto: interferendo cioè con una struttura cellulare funzionale al virus, piuttosto che con la particella virale di per sé. Questo tipo di approccio potrebbe quindi portare all'inibizione del virus evitando l'insorgenza del fenomeno della resistenza ai più comuni farmaci antivirali.

Pertanto, è un oggetto della presente invenzione, l'uso del resveratrolo per la preparazione di un medicamento utile per la prevenzione e/o il trattamento delle infezioni da virus dell'in-

fluenza. In un'applicazione preferita della presente invenzione, il resveratrolo viene utilizzato contro il virus dell'influenza umana. In una sua più ampia applicazione, la presente invenzione ha per oggetto anche l'uso del resveratrolo per la preparazione di un medicamento utile per il trattamento delle infezioni da virus dell'influenza nel settore veterinario.

La presente invenzione sarà ora illustrata in dettaglio anche per mezzo di esempi e figure, nelle quali:

Figura 1 illustra l'effetto del resveratrolo sulla replicazione del virus dell'influenza PR8 in cellule MDCK, e precisamente, in Figura 1A nel caso di somministrazione post-infezione, in Figura 1B nel caso di somministrazione pre-infezione e in Figura 1C nel caso di somministrazione pre-post-infezione;

Figura 2 illustra l'effetto del resveratrolo su monostrati confluenti di cellule MDCK non infettate, e precisamente, il numero di cellule vive;

Figura 3 illustra la caratterizzazione dell'attività antivirale del resveratrolo, e precisamente, in Figura 3A il trattamento durante l'adsorbimento virale e in Figura 3B l'effetto sulle particelle virali;

Figura 4 illustra la caratterizzazione dell'attività antivirale del resveratrolo, e precisamente, in Figura 4A nel caso di somministrazione subito dopo l'infezione e rimozione a diversi tempi e in Figura 4B nel caso di aggiunta a diversi tempi rispetto all'infezione;

Figura 5 illustra l'apoptosi in cellule MDCK trattate con resveratrolo;

Figura 6 illustra la correlazione tra effetto antivirale del resveratrolo con lo stato redox intracellulare;

Figura 7 illustra l'effetto del resveratrolo sulla sintesi delle proteine virali del virus dell'influenza PR8;

Figura 8 illustra il risultato della PCR per l'mRNA delle proteine virali tardive;

Figura 9 illustra l'effetto del resveratrolo in vivo dopo infezione con il virus dell'influenza PR8.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

Allo scopo di illustrare l'efficacia della presente invenzione, sono stati effettuati studi in vitro utilizzando il virus influenzale A/PR8/34, sottotipo H1N1 (di seguito brevemente virus PR8). Questo ceppo è stato utilizzato in via puramente esemplificativa, restando sottinteso che la presente invenzione si applica al virus dell'influenza genericamente inteso.

Materiali e metodi

Il resveratrolo è un prodotto comunemente disponibile in commercio, oppure ottenibile con metodi noti in letteratura. La sostanza è stata disciolta in DMSO (80 mg/ml). Le concentrazioni usate per gli esperimenti sono state ottenute mediante successive diluizioni in RPMI 1640. Tutti i campioni di controllo sono stati trattati con DMSO alle stesse dosi utilizzate per dissolvere il

resveratrolo. A queste concentrazioni il DMSO non produceva alcun effetto tossico sulle cellule.

Colture cellulari

Per lo studio della replicazione del virus influenzale sono state utilizzate cellule MDCK (cellule epiteliali di rene di cane). Le cellule sono state coltivate in fiasche T-25 o in piastre di Linbro da 6 e 24 pozzetti in terreno di coltura RPMI 1640 addizionato di L-glutammina, Penicillina-Streptomicina e siero fetale di bovino (FCS) al 10% e mantenute a 37°C, in atmosfera al 5% di CO₂. I monostrati cellulari a confluenza sono stati staccati con una soluzione allo 0,25% di tripsina, centrifugate e riseminate in terreno fresco. La conta delle cellule è stata effettuata utilizzando un emocitometro e la vitalità cellulare determinata mediante esclusione con colorante vitale Trypan Blu (0,02%).

Produzione del virus

Il virus è stato prodotto mediante inoculazione di una sospensione virale opportunamente diluita nella cavità allantoidea di uova embrionate di pollo di 10 giorni. Dopo aver incubato le uova a 37°C per 72 ore, il fluido allantoideo, contenente le particelle virali neoformate, è stato chiarificato tramite centrifugazione a +4°C ed infine conservato a -80°C.

Titolazione del virus

La titolazione del virus è stata eseguita mediante la tecnica dell'emoagglutinazione che si basa sulle capacità, proprie di questo virus, di agglutinare le emazie.

Il virus indiluito presente nel fluido allantoideo è stato titolato mediante diluizione scalare con tampone fosfato salino (PBS) in piastre da 96 pozzetti; alle quali è stata successivamente aggiunta una sospensione di emazie umane del gruppo 0 Rh+ allo 0,5%. Le piastre sono state quindi lasciate a temperatura ambiente per un tempo sufficiente a far avvenire la reazione d'emoagglutinazione. Il titolo virale del campione, espresso in unità emoagglutinantanti (HAU), è stato rappresentato dall'ultima diluizione che dà luogo a emoagglutinazione completa. Il rilascio di virus da parte di cellule infettate è stato valutato con la stessa procedura sui surnatanti dei campioni infetti che sono stati prelevati a 24 e 48 ore dall'infezione.

Infezione virale

I monostrati confluenti di cellule MDCK sono stati lavati con PBS e infettati con il virus (0,2 molteplicità di infezione [m.o.i.]). In particolare il virus è stato opportunamente diluito in RPMI senza FCS e aggiunto alla cellula nel minimo volume. Dopo 1 ora di incubazione a 37°C (periodo di adsorbimento del virus), l'inoculo è stato rimosso e i monostrati, dopo lavaggio con PBS per rimuovere l'eccesso di virus non adsorbito, sono stati mantenuti in terreno fresco contenente FCS 2%. Il resveratrolo è stato aggiunto a varie concentrazioni (1, 5, 10, 15, 20 e 40 µg/ml), secondo i seguenti schemi di trattamento: a) 24 ore prima dell'infezione (pre); b) subito dopo l'adsorbimento del virus alle cellule (post); c) 24 ore prima e subito dopo l'adsorbimento del virus alle cellule

dell'infezione (pre-post). In tutti i casi la sostanza è stata lasciata in incubazione per tutta la durata dell'esperimento. Dopo 24 e 48 ore dall'infezione, il virus rilasciato nel surnatante è stato titolato mediante valutazione delle unità emoagglutinanti. Come mostrato nella Figura 1, il resveratrolo aggiunto dopo l'infezione (post) inibiva la replicazione virale in modo dose-dipendente. Alla concentrazione di 20 $\mu\text{g/ml}$, il titolo virale risultava ridotto dell'87% rispetto ai controlli infettati e non trattati, senza che fossero evidenziati effetti tossici su cellule non infettate. Al fine di determinare l'eventuale grado di tossicità sulle cellule MDCK, queste sono state trattate con resveratrolo, dopo la confluenza del monostrato, a varie concentrazioni (5, 10, 15, 20 e 40 $\mu\text{g/ml}$). I risultati ottenuti dimostrano che alle dosi che provocavano inibizione significativa del virus influenzale (10-20 $\mu\text{g/ml}$) si osservava una piccola diminuzione del numero cellulare, probabilmente dovuto a un rallentamento nella proliferazione cellulare (Figura 2A). Tuttavia, a queste dosi, non si osservavano alterazioni morfologiche delle cellule. Alla concentrazione di 40 $\mu\text{g/ml}$, alla quale la replicazione virale era completamente bloccata, si osservavano invece effetti tossici con un aumento della mortalità cellulare (Figura 2B). In base a questo risultato, per gli esperimenti successivi è stata utilizzata la dose di 20 $\mu\text{g/ml}$, che produceva la massima attività antivirale senza effetti tossici.

Caratterizzazione dell'attività antivirale

Con l'obiettivo di individuare le fasi del ciclo replicativo virale controllate dal resveratrolo, la sostanza è stata aggiunta secondo diversi schemi di trattamento rispetto alle varie fasi del ciclo vitale del virus. In una prima fase, al fine di valutare se il resveratrolo interferisse con l'entrata del virus nelle cellule, la sostanza è stata aggiunta a concentrazione di 20 µg/ml esclusivamente durante la fase d'adsorbimento virale (per un'ora a 37°C) e successivamente rimossa. La misurazione della replicazione virale dopo 24 ore si è dimostrata sovrapponibile alla replicazione ottenuta nelle cellule di controllo, dimostrando che l'entrata del virus non era inibita dal farmaco (Figura 3). Per valutare, inoltre, se il resveratrolo fosse in grado di inattivare direttamente il virus, lo stesso è stato incubato con la sostanza a una concentrazione di 40 µg/ml per un'ora a 37°C. Successivamente, il virus, così trattato, è stato diluito 1:500 e utilizzato per l'infezione delle cellule. In tali condizioni non è stata osservata una diminuzione della replicazione virale. Questi risultati hanno suggerito che il resveratrolo non inattiva direttamente la particella virale. In una seconda fase, le cellule sono state infettate e trattate con resveratrolo, sempre utilizzando la stessa concentrazione (20 µg/ml), ma la sostanza è stata aggiunta a vari tempi dopo l'infezione (0, 3, 6, e 9 ore). La replicazione virale, valutata come HAU/ml a 24 ore dopo l'infezione, ha evidenziato che questa veniva inibita in modo significativo solo se il resveratrolo veniva aggiunto entro 3 ore dall'infezione (Figura 4B). Al contrario, se il resveratrolo, aggiunto subito dopo l'infe-

zione, veniva rimosso a vari tempi (0, 3, 6, 9 e 24 ore), l'inibizione della replicazione si osservava solo se il trattamento aveva una durata di almeno 9 ore. Inoltre, i risultati raffigurati in Figura 4 mostrano anche che l'attività antivirale, una volta ottenuta, non era reversibile con la sospensione del trattamento.

La replicazione virale è stata valutata anche con l'analisi della comparsa di antigeni virali sulla superficie della cellula infetta mediante immunofluorescenza. L'analisi delle proteine virali per immunofluorescenza è stata effettuata con un microscopio a fluorescenza utilizzando un filtro che emette nel verde (FITC) (obiettivo 100x). Le cellule MDCK coltivate su vetrini coprioggetti per 24 ore sono state infettate e, a 18 ore dall'infezione, sono state fissate con metanolo-acetone 1:1 a 4°C per 15 min. Successivamente, le cellule sono state lavate due volte in PBS e permeabilizzate con una soluzione di PBS-TRITON 0,1% per 5 min. Il blocco dei siti aspecifici è stato effettuato con latte 1% sciolto in PBS per 30 min. a temperatura ambiente. Successivamente, sono stati aggiunti anticorpi monoclonali specifici (topo anti-influenza NP e topo anti-influenza M) contro le proteine virali, diluiti 1:50 in PBS per 30 minuti a temperatura ambiente. L'anticorpo primario è stato rivelato con un anticorpo secondario coniugato alla fluoresceina (anti-topo-FITC, Sigma).

Analisi della sintesi di proteine virali e correlazione con l'attività antivirale del resveratrolo

Le proteine virali sono state analizzate mediante Western Blotting. A diversi tempi dall'infezione virale, le cellule sono state lisate utilizzando appositi tamponi di lisi. Uguali quantità di proteine sono state quindi caricate su gel di poliacrilammide in SDS. Dopo elettroforesi, le proteine sono state trasferite su membrana di nitrocellulosa e trattate con anticorpo policlonale anti-influenza. Dopo incubazione e opportuni lavaggi, i filtri sono stati trattati con un secondo anticorpo coniugato alla perossidasi e le proteine virali sono state evidenziate mediante la tecnica della chemiluminescenza (ECL), utilizzando un substrato della perossidasi (luminolo) che, reagendo con l'enzima, emette una luce e impressiona la lastra autoradiografica. Le cellule sono state trattate con resveratrolo a varie concentrazioni (5, 10, 15 e 20 µg/ml). Per permettere una migliore visualizzazione delle proteine virali, la corsa elettroforetica è stata effettuata utilizzando un gel di poliacrilammide al 10% (Figura 7A) e un gel a gradiente (Figura 7B). Il resveratrolo alle concentrazioni di 15 e 20 µg/ml inibiva in modo pressochè totale la sintesi delle proteine tardive del virus influenzale Emoagglutinina (H0-H1, H2) e Matrice (M). Al contrario, l'espressione delle proteine precoci nucleocapsidiche (nucleoproteina (NP), polimerasi (P) veniva inibita, ma in misura inferiore rispetto alle tardive.

Analisi della sintesi di RNA messaggeri

Al fine di individuare il meccanismo di inibizione delle proteine virali, le cellule MDCK, infettate e trattate con resveratrolo a

diverse concentrazioni precedentemente descritte, sono state analizzate mediante la tecnica della PCR descritta da Tobita e al. (*J. of General Virol.* 78, 563-566, 1997). Le cellule MDCK infettate con il virus e/o trattate con resveratrolo sono state omogeneizzate con il reagente GIBCO BRL TRIZOL. Dopo incubazione a temperatura ambiente per 5 minuti, è stato aggiunto cloroformio (0,2 ml per campione) e i campioni sono stati incubati a 15-30°C per 3 minuti. Successivamente, sono stati centrifugati a 10.000 gpm per 15 minuti a +4°C ed è stata recuperata la fase acquosa contenente l'RNA. Sono stati aggiunti 0,5 ml di isopropanolo e i campioni sono stati incubati a 15-30°C per 10 minuti e successivamente centrifugati. I surnatanti ottenuti sono stati rimossi e il precipitato di RNA è stato trattato con etanolo 75% e centrifugata a 8.000 gpm per 5 minuti a 2-8°C. Infine, il precipitato è stato asciugato all'aria e sciolto in 20 µl di acqua-DEPC (dietyl pirocarbonato).

L'RNA ottenuto è stato trascritto utilizzando trascrittasi inversa. La retrotrascrizione è stata effettuata su 5 µl di RNA di ogni campione in una miscela composta da *random primers*, i quattro deossinucleotidi (dNTP=dATP, dCTP, dGTP, dTTP), ditiotreitolo (DTT), tampone RT (Life Technologies). La sintesi del DNA complementare (cDNA) è stata fatta avvenire lasciando la miscela per 10 minuti a 22°C, poi per 60 minuti a 42°C e infine la reazione è stata inattivata per 10 minuti a 75°C. Il cDNA così ottenuto è stato poi utilizzato in PCR.

Nella PCR è stata utilizzata la *Taq* polimerasi. La PCR è stata condotta nelle sue tre fasi di denaturazione, appaiamento (annealing) e allungamento (elongation) alle rispettive temperature di 95, 48 e 72°C. Il ciclo è stato ripetuto per 20 volte. Gli oligonucleotidi usati per l'amplificazione dell'RNA virale sono: per il gene virale che codifica per la proteina emoagglutinina (HA) 5' primer: 5'-ACCAAAATGAAGGCAAACC-3', 3' primer: 5'-TTACTG-TTAGACGGGTGAT-3'; per il gene virale che codifica per la proteina di Matrice (M) 5' primer: 5'-ATGAGTCTTCTAACCG-3', 3' primer: 5'-ACTGCTTTGTCCATGT-3'.

Il prodotto della PCR è stato fatto correre in elettroforesi (100 Volt) su un gel di agarosio all'1% in un tampone in cui è stato messo bromuro di etidio per visualizzare il DNA con un transilluminatore UV.

I campioni ottenuti sono stati valutati rispettivamente 4, 8 e 20 ore dopo l'infezione virale. Gli RNA messaggeri per le proteine virali HA e M non sono stati osservati alle 4 ore, sia per il gruppo di controllo, sia per il gruppo trattato con resveratrolo. I risultati mostrano che la sintesi degli mRNA dopo 20 ore dall'infezione non viene influenzata dal trattamento con resveratrolo. L'osservazione a 4 ore mostra che il resveratrolo provoca solo un ritardo nella sintesi dei messaggeri per queste proteine (Figura.8). Questi risultati hanno suggerito che il resveratrolo alle dosi di 20 µg/ml provoca un ritardo nel rilascio degli RNA messaggeri per le proteine tardive virali (HA e M), valutate a 8 ore dall'infezione.

Localizzazione della proteina NP

Considerando che l'inibizione della protein chinasi C in cellule infettate dal virus influenzale provoca una forte diminuzione nell'espressione della proteina M, insieme alla ritenzione della nucleoproteina nel nucleo della cellula infettata (*J. Virol*, 74, 1781-86, 2000), cellule MDCK infettate con il virus PR8 e trattate o non con resveratrolo alla concentrazione di 20 µg/ml sono state colorate con anticorpi specifici anti-M e anti-P e osservate al microscopio a fluorescenza. I risultati hanno evidenziato che, mentre nelle cellule non infettate l'NP è stata osservata sia nel nucleo sia nel citoplasma e la M1 preferenzialmente nel citoplasma, nelle cellule trattate con resveratrolo l'NP è trattenuta nel nucleo e la M, significativamente inibita, è ugualmente osservabile solo nel nucleo. Tale fenomeno può essere riconducibile all'inibizione di proteine cellulari con funzione chinastica. I dati suggeriscono quindi che il meccanismo dell'azione antivirale possa essere legato all'inibizione di proteine con funzione chinastica già descritto in precedenza (*FEBS Letters*, 45, 63-7, 1999).

Dosaggio del glutatione ridotto e ossidato

Il dosaggio del glutatione è stato effettuato in seguito alla formazione di S-carbossimetil-derivati dei tioli liberi con acido iodoacetico seguita dalla conversione dei gruppi NH₂ terminali a 2,4-dinitrofenil-derivati dopo la reazione con 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene (*Anal. Biochem.*, 106, 55-62, 1980)

Le cellule MDCK sono state staccate mediante la tecnica dello "scraping". Successivamente, le cellule sono state centrifugate a 1.200 gpm per 5 minuti. Le cellule sono state lavate due volte in PBS e il precipitato, ottenuto dopo centrifugazione, è stato risospeso in 200 µl di tampone. I lisati cellulari, ottenuti con cicli ripetuti di congelamento e scongelamento, sono stati deproteinizzati mediante precipitazione in acido metafosforico al 5%. Dopo centrifugazione a 22.300 g, i tioli a basso peso molecolare presenti nel surnatante sono stati derivatizzati con acido iodoacetico al 10% v/v (15 mg/ml) e neutralizzati con NaHCO₃ in polvere. Dopo 1 ora di incubazione al buio è stata aggiunta una soluzione di 1-cloro-2,4-dinitrobenzene all'1,5% v/v (1,5 ml/98,5 ml di etanolo assoluto). Dopo aver aggiunto il reattivo di Sanger, i campioni sono stati incubati per 12 ore al buio e la separazione delle varie specie di glutatione eseguita tramite una colonna cromatografica da HPLC µBondapak NH₂, 3,9x300 mm (Millipore). Per misurare il contenuto totale di GSH si è fatto riferimento a una curva standard ottenuta con GSH purificato. Il contenuto di GSH è espresso in GSH nmoli/mg di proteine presenti nel campione lisato. La concentrazione proteica è stata calcolata utilizzando il metodo di Lowry (*Biol. Chem.*, 193, 265-75, 1951). Questo metodo sfrutta la capacità delle proteine di ridurre il reattivo di Fonil-Ciocalteau in una soluzione alcalina con ioni Cu²⁺, grazie alla presenza dei gruppi fenolici di alcuni amminoacidi, quali triptofano, tirosina, cisteina e istidina. Il triptofano e la tirosina reagiscono per mezzo dei

loro gruppi fenolici particolarmente reattivi, la cisteina attraverso il gruppo -SH e l'istidina con l'anello imidazolico. Il prodotto della reazione di riduzione è evidenziato dalla formazione di composti colorati per reazione con gli amminoacidi aromatici delle proteine, infatti, la soluzione acquista un colore azzurro particolarmente intenso che ha un massimo di assorbimento a 695 nm. In base all'entità dell'assorbimento si ricava dunque la concentrazione delle proteine rispetto a una retta di taratura ottenuta utilizzando varie concentrazioni di albumina di siero bovino come standard.

Al fine di valutare la possibile correlazione della sua attività antivirale con una modulazione dello stato redox, la concentrazione di GSH cellulare di cellule MDCK, trattate a diverse concentrazioni di resveratrolo ed infettate o non con il virus, è stata valutata mediante analisi in HPLC 24 ore dopo l'infezione. Sorprendentemente, il resveratrolo aggiunto alle cellule MDCK non infettate produceva una diminuzione dei livelli di GSH intracellulare, rispetto alle cellule non trattate (Figura 6). L'aggiunta di resveratrolo a cellule infettate, pur inibendo la replicazione virale, non ripristinava i livelli di GSH diminuiti dall'infezione.

Analisi dell'apoptosi

Per quanto riguarda l'analisi dell'apoptosi, le cellule MDCK, sono state infettate con il virus PR8. Dopo l'adsorbimento virale, le cellule sono state trattate con resveratrolo a varie concentrazioni (5, 10, 15 e 20 µg/ml). Dopo 24 ore dall'infezione, le cellule sono state staccate utilizzando una soluzione allo 0,25% di tripsina e

successivamente centrifugate a 1.200 gpm per 5 minuti. Il precipitato così ottenuto è stato analizzato mediante la tecnica del FACs dopo marcatura con ioduro di propidio.

Al fine di valutare se l'induzione di morte cellulare per apoptosi fosse coinvolta nell'effetto antivirale del resveratrolo, cellule MDCK sono state infettate o non con il virus PR e trattate con la sostanza alle varie concentrazioni. La morte cellulare per apoptosi è stata valutata al FACS dopo marcatura con ioduro di propidio. Come mostrato in Figura 5, il resveratrolo provocava nelle cellule non infettate un certo grado di morte cellulare per apoptosi che varia dall'8 al 32% a seconda delle dosi (5 e 20 µg/ml, rispettivamente). L'infezione di per sè induceva apoptosi nel 12% delle cellule infettate. Sebbene l'aggiunta di dosi crescenti di resveratrolo provocava un incremento di mortalità, non si osservavano differenze significative tra cellule infettate e cellule non infettate e trattate con dosi antivirali del farmaco (35-37% di apoptosi rispettivamente).

A ulteriore conferma dei risultati della presente invenzione, e in via esemplificativa, vengono forniti di seguito studi *in vivo*.

ESEMPIO

Sono stati utilizzati topi femmine inbred Balb/cAnNCrIBR, di 4 settimane di età. Il resveratrolo, disciolto in PBS, è stato somministrato agli animali per via intraperitoneale a vari tempi dall'infezione con virus influenzale. Le concentrazioni di resveratrolo sono state scelte in modo da ottenere nel sangue degli ani-

mali un intervallo di dosi assimilabili a quelle efficaci *in vitro* (10-20 µg/ml).

I topi sono stati inoculati per via intranasale (i.n.) con una sospensione contenente il virus influenzale A/PR8 alla molteplicità di infezione 2 HAU/topo, dopo blanda anestesia con etere. In base a precedenti dati sperimentali, il virus influenzale a questa molteplicità di infezione produce una polmonite emorragica che porta a morte l'80% degli animali a una settimana dall'infezione. Al fine di monitorare l'andamento dell'infezione, oltre allo studio delle curve di sopravvivenza, sono stati seguiti sia parametri virologici che immunologici.

Come parametro virologico, è stata determinata la carica virale. A diversi tempi dall'infezione, i polmoni dei topi infetti e di controllo sono stati prelevati, pesati e omogeneizzati in RPMI contenente antibiotici. Dopo centrifugazione, i surnatanti sono stati opportunamente diluiti e la carica virale è stata analizzata mediante la prova CPE-50%. In base a questo metodo, cellule MDCK confluenti sono state infettate con i surnatanti diluiti serialmente in RPMI aggiunto di antibiotici al 2% di FCS e incubate per tre giorni a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂. Sono stati infine contati, per ogni diluizione, i pozzetti che mostrano effetto positivo e rapportati a quelli che mostrano effetto citopatico negativo secondo la formula di Reed e Muench. Il titolo CPE-50% è stato calcolato in unità/ml.

Come parametro immunologico sono stati valutati i livelli di citochine infiammatorie attraverso il metodo ELISA. Per l'esperimento è stata impiegata una piastra da 96 pozzetti. Per il rivestimento della piastra sono stati utilizzati anticorpi monoclonali contro le citochine da studiare, incubati per una notte a 4°C. Successivamente, sono stati aggiunti 200 µl/pozzetto di BSA 1% in tampone carbonato per 30 minuti a 37°C. Sono poi stati effettuati lavaggi con TBS + Tween 20 0,5% ed aggiunti i campioni per 4 ore a 37°C. Come curva di riferimento sono state utilizzate citochine ricombinanti in diluizione scalare. In seguito, sono stati effettuati i lavaggi ed è stato aggiunto un anticorpo policlonale contro le citochine, diverso dal primo, lasciato per una notte a +4°C. Successivamente a lavaggi con TBS e Tween 20 0,5%, MgCl₂ 2 mM, è stato aggiunto il terzo anticorpo coniugato all'enzima fosfatasi alcalina per 4 ore a 37°C. Infine, è stato aggiunto un substrato per l'enzima (100 µl/pozzetto) e la lettura è stata effettuata attraverso il lettore ELISA utilizzando un filtro da 405 nm. Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: 1) monoclonale Rat anti-topo TNF-alfa/ricombinante topo IL-6; 2) ricombinante topo TNF-alfa/ricombinante topo IL-6; 3) policlonale coniglio anti-topo TNF-alfa/policlonale capra anti-topo IL-6; 4) capra anti-coniglio IgG-fosfatasi alcalina/anti-capra IgG fosfatasi alcalina.

L'efficacia del resveratrolo è stata studiata in un modello d'infezione sperimentale da virus dell'influenza in topo. In tale modello, l'inoculazione intranasale di virus provoca una grave

polmonite emorragica che porta gli animali a morte in un periodo di 7-10 giorni dall'infezione. Il disegno sperimentale prevedeva la valutazione dell'efficacia terapeutica della sostanza in esame, valutata in base alla sopravvivenza degli animali infettati. A questo scopo, il resveratrolo è stato somministrato agli animali a varie dosi, con cadenza giornaliera per 7 giorni, a partire da poche ore dopo l'infezione. I risultati ottenuti hanno mostrato che mentre la mortalità degli animali non trattati arrivava all'80%, la somministrazione di resveratrolo (1 mg/kg) diminuiva significativamente la mortalità e il 60% degli animali sopravviveva all'infezione (Figura 9).

RIVENDICAZIONI

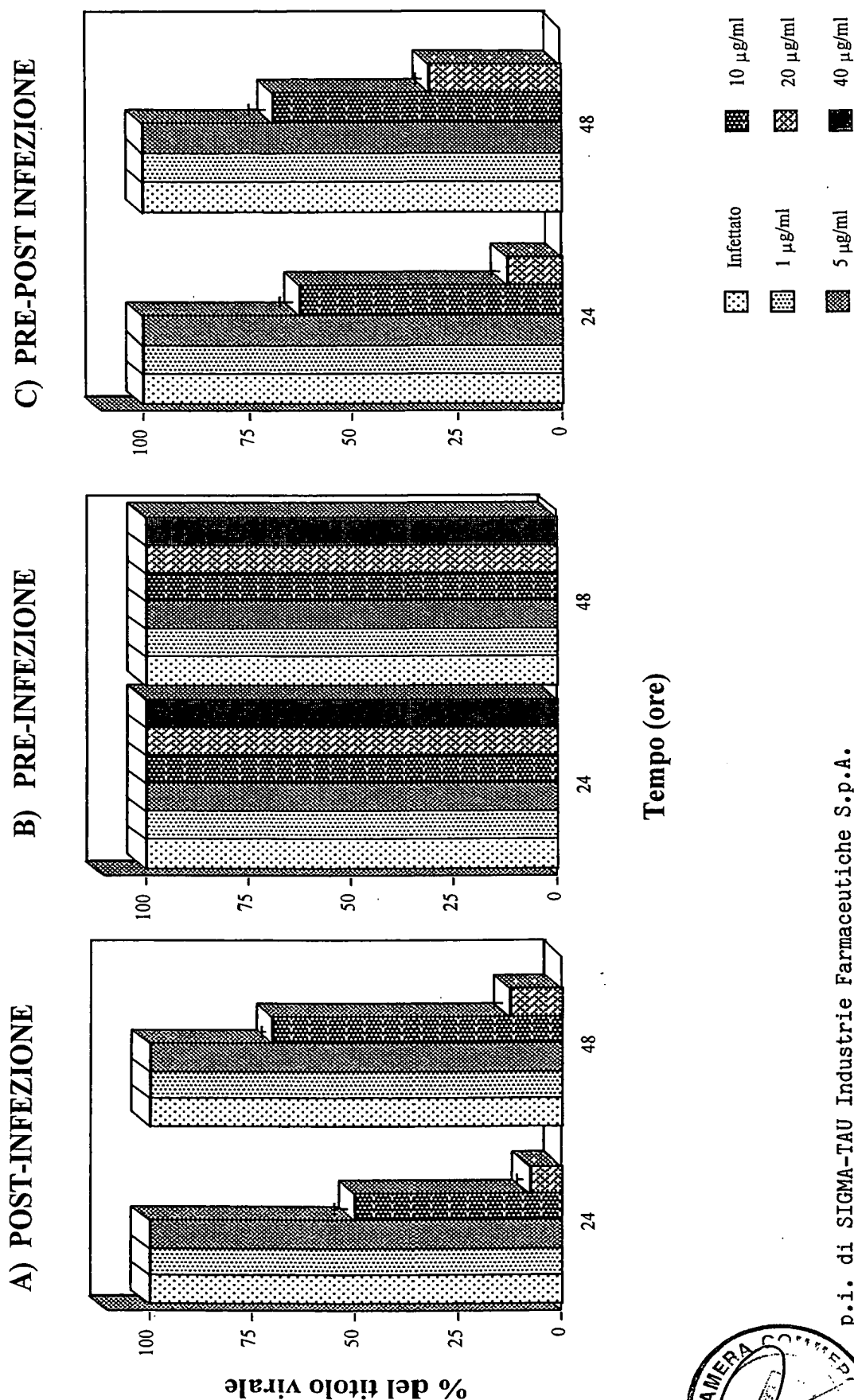
1. Uso del resveratrolo come principio attivo nella preparazione di un medicamento utile per la prevenzione e/o trattamento delle infezioni da virus dell'influenza.
2. Uso secondo la rivendicazione 1, dove detto virus è il virus dell'influenza umana.
3. Uso secondo la rivendicazione 1, dove detto medicamento è utile per il trattamento delle infezioni da virus nel settore veterinario.

p.i. di SIGMA-TAU Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A.

Dott. Marco Spadaro



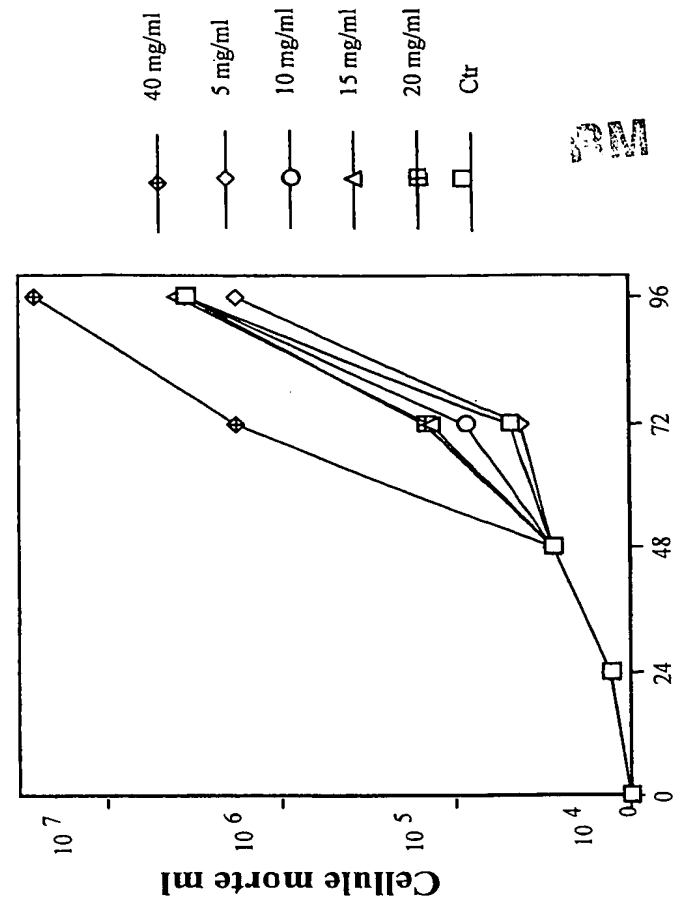
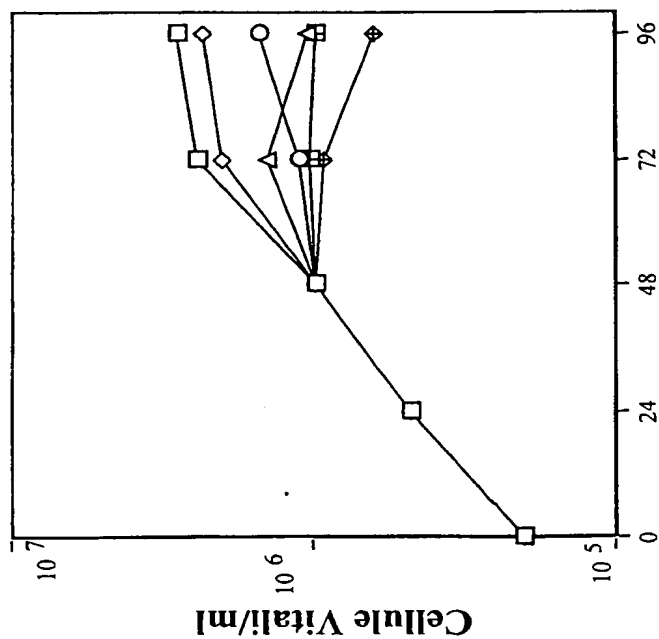
**Fig.1 EFFETTO DEL RESVERATROLO SULLA REPLICAZIONE VIRALE
DEL VIRUS DELL'INFLUENZA PR8 IN CELLULE MDCK**



p.i. di SIGMA-TAU Industrie Farmaceutiche S.p.A.

Dott. Marco Spadaro

Fig.2 EFFETTO DEL RESVERATROLO SU MONOSTRATI CONFLUENTI DI CELLULE MDCK NON INFETTATE



p.i. di SIGMA-TAU Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A.

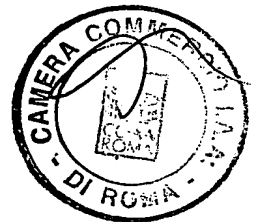
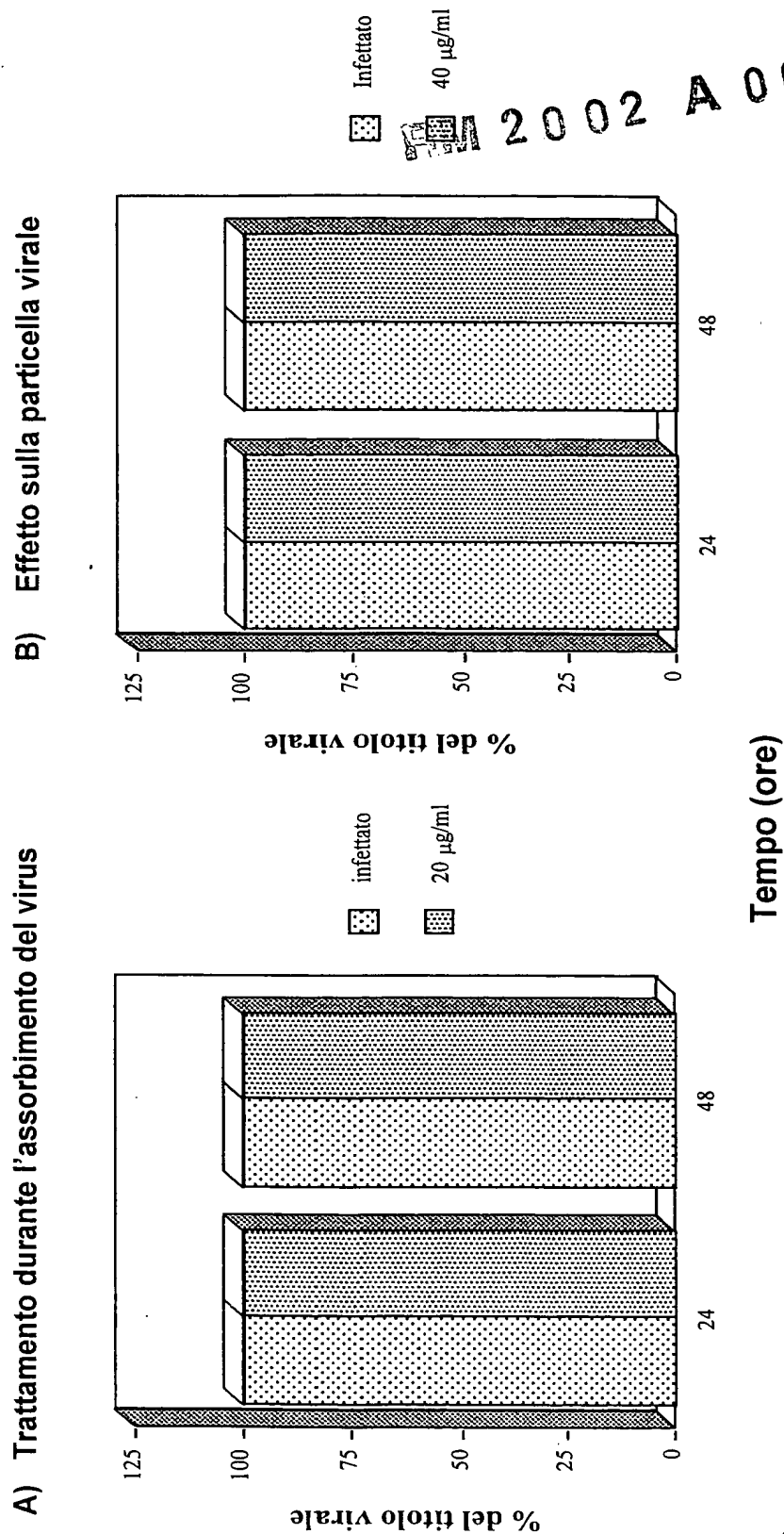
Dott. Marco Spadaro

Tempo di coltura (ore)

Tempo di coltura (ore)

PM 2002 A 000562

**Fig.3 CARATTERIZZAZIONE DELL'ATTIVITA' ANTIVIRALE
DEL RESVERATROLO**



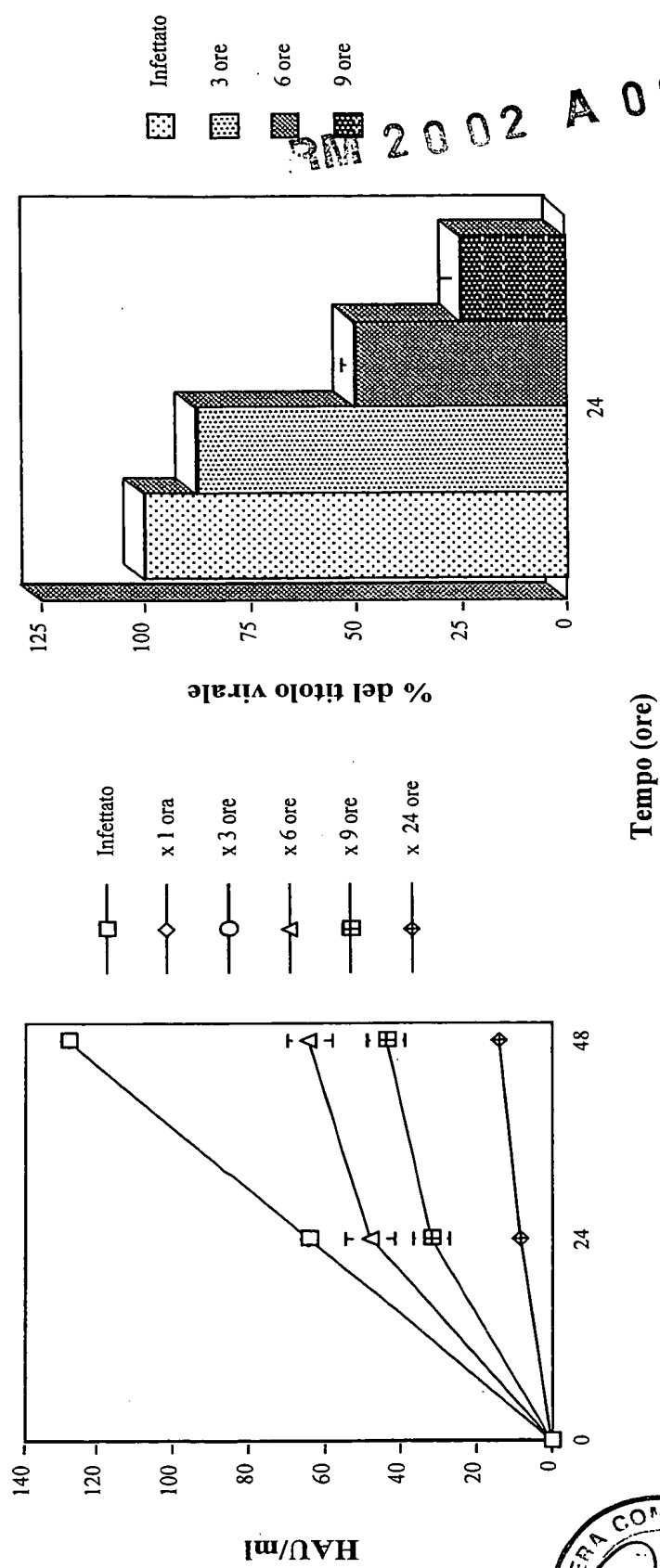
p.i. di SIGMA-TAU Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A.
Dott. Marco Spadaro

2002 A 000562

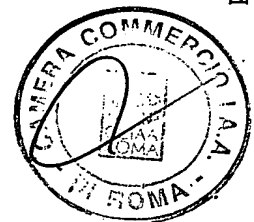
**Fig. 4 CARATTERIZZAZIONE DELL'ATTIVITA' ANTIVIRALE
DEL RESVERATROLO**

A) FARMACO AGGIUNTO SUBITO DOPO LA "CHALLENGE" E RIMOSSO A TEMPI DIVERSI

B) FARMACO AGGIUNTO A TEMPI DIVERSI RISPETTO ALLA "CHALLENGE" VIRALE



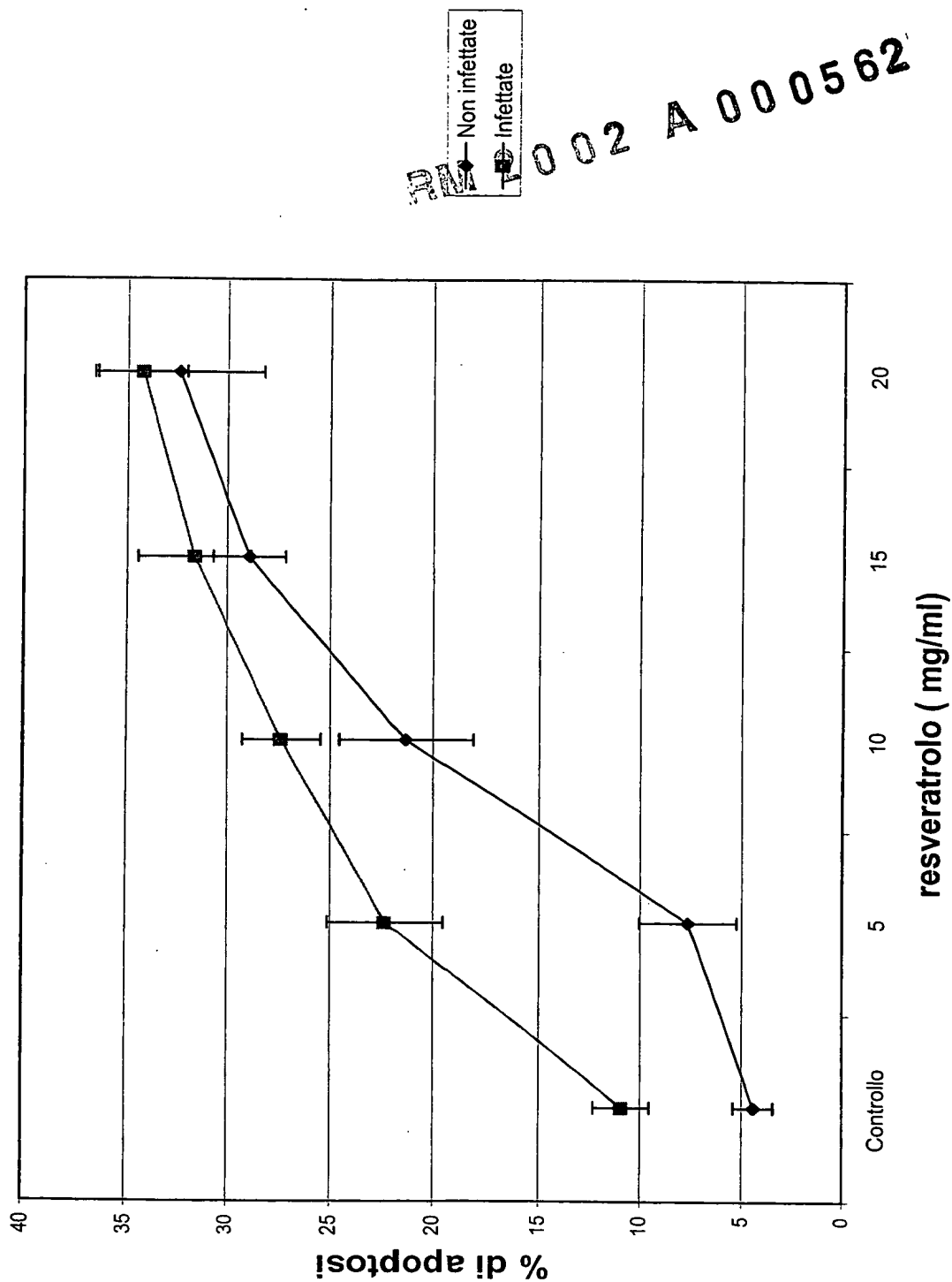
2002 A 000562



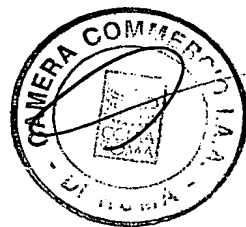
p.i. di SIGAM-TAU Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A.

Dott. Marco Spadaro

Fig.5 Apoptosi in cellule MDCK trattate con resveratrolo



RM 002 A 000562

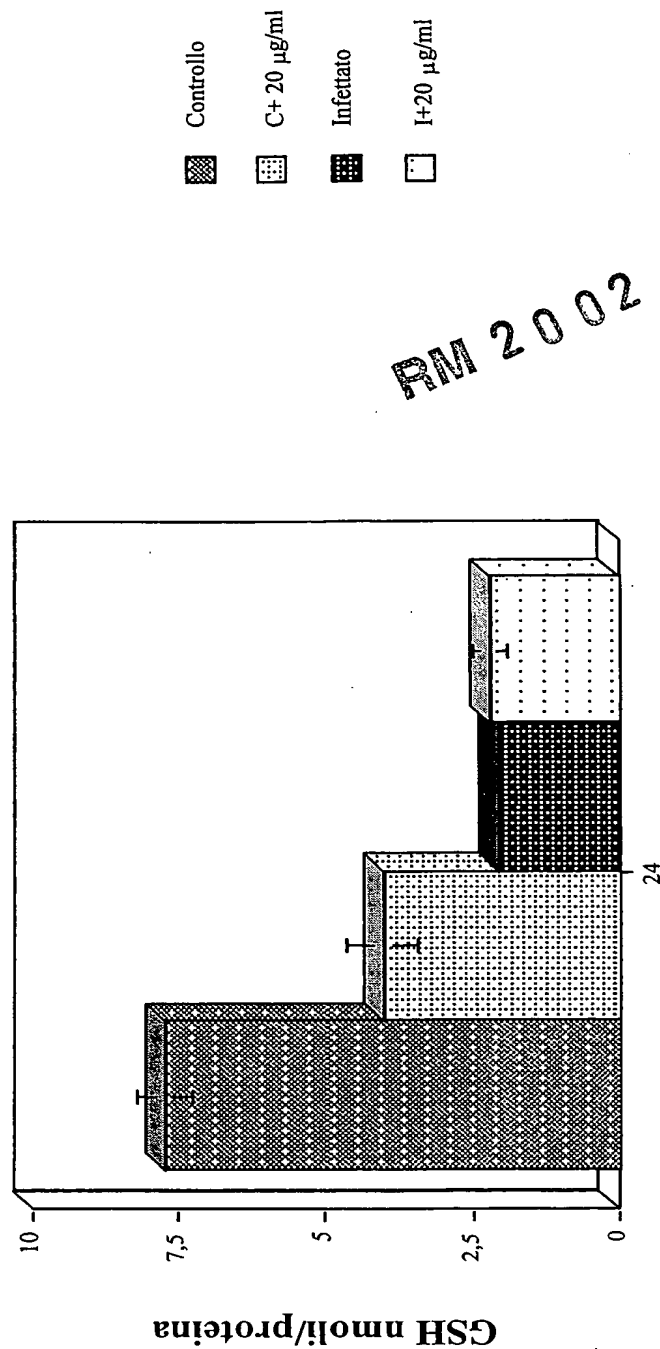


p.i. di SIGMA-TAU Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A.

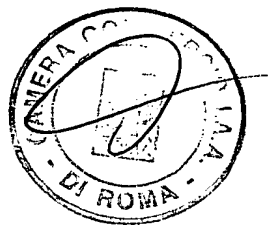
Dott. Marco Spadaro

Marco Spadaro

**Fig. 6 CORRELAZIONE DELL'EFFETTO ANTIVIRALE DEL RESVERATROLO CON
LO STATO DI REDOX INTRACELLULARE**



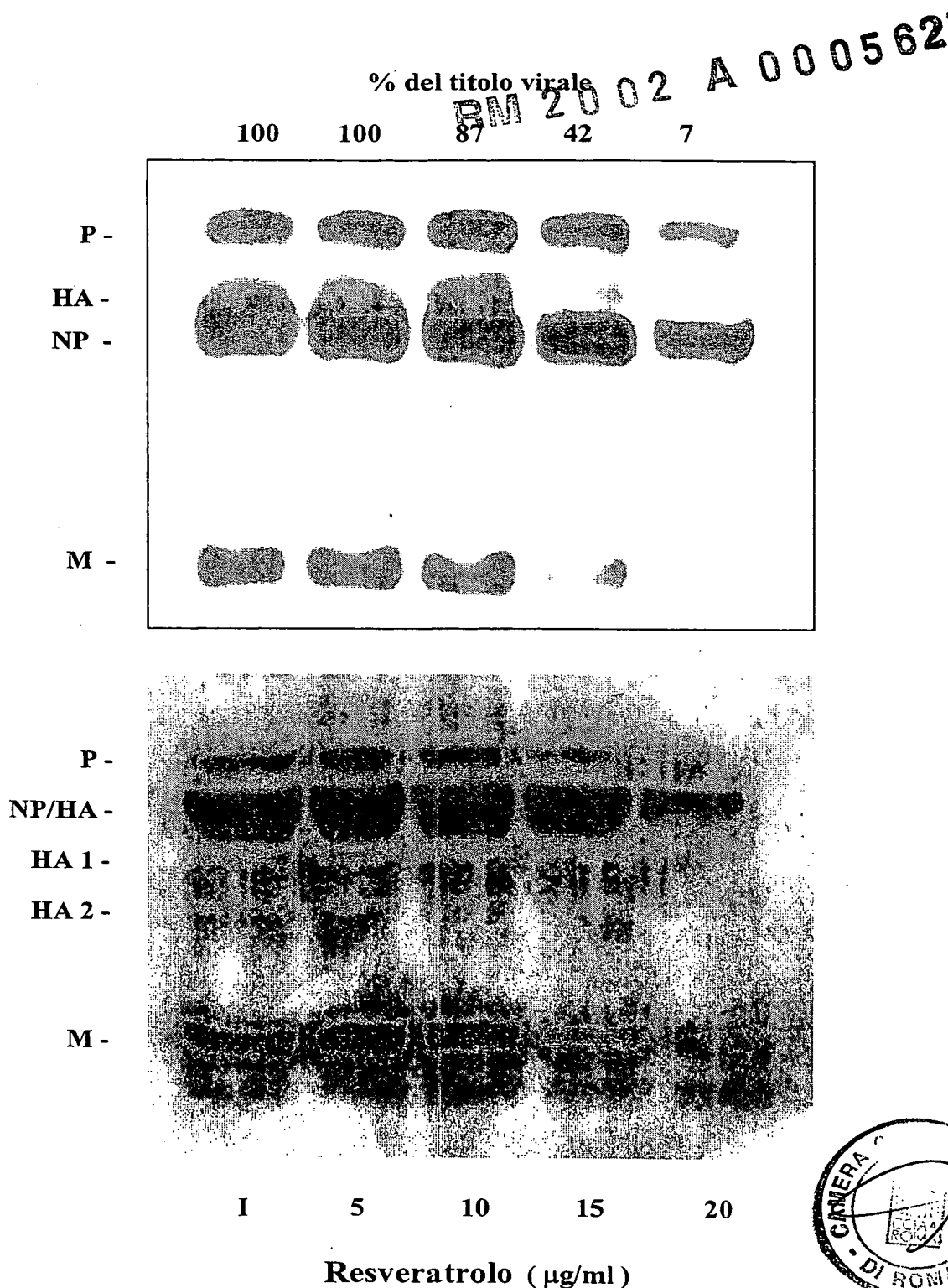
RM 2002 A 000562



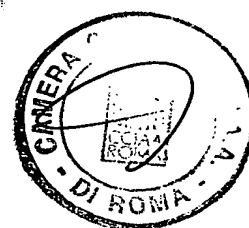
p.i. di SIGMA-TAU Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A.

Dott. Marco Spadaro

Fig. 7 EFFETTO DEL RESVERATROLO SULLA SINTESI DELLE PROTEINE DEL VIRUS DELL'INFLUENZA A PR8

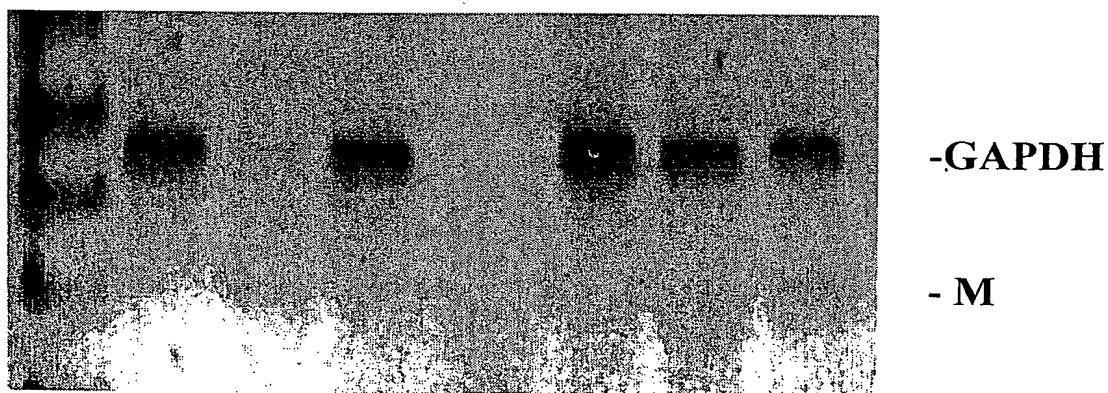


p.i. di SIGMA-TAU Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A.
Dott. Marco Spadaro



RM 2002 A 000562

Fig. 8
RT-PCR PER mRNA DELLE PROTEINE
VIRALI TARDIVE



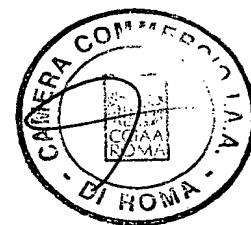
C I I+20

C I I+20

Resveratrolo ($\mu\text{g/ml}$)

p.i. di SIGMA-TAU Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A.

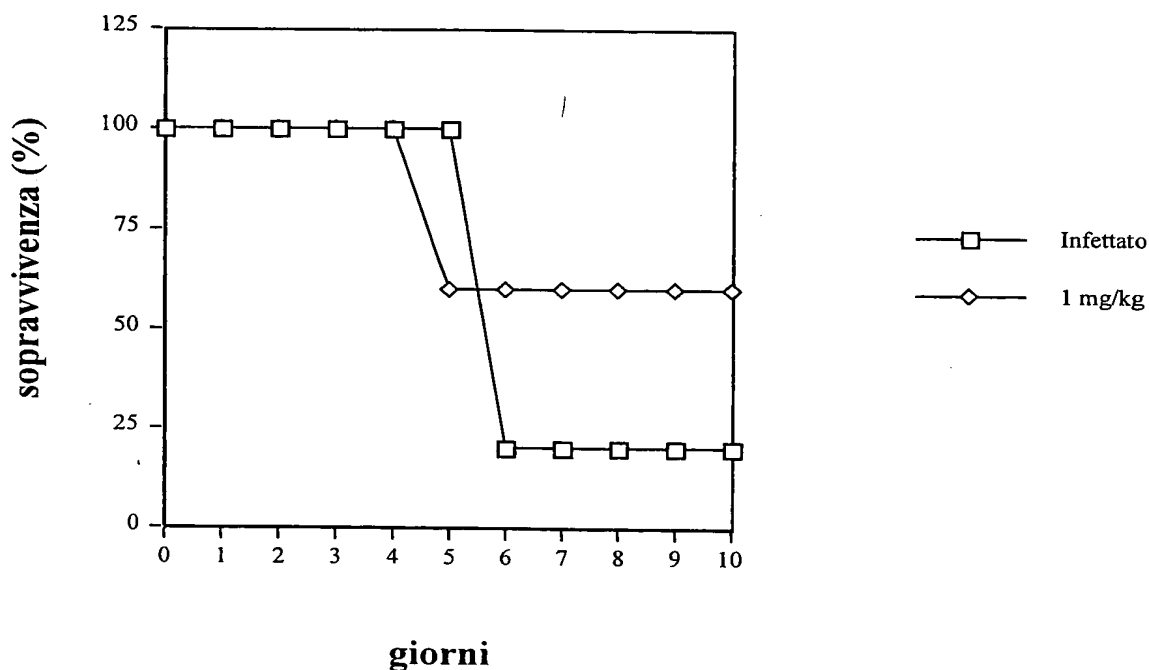
Dott. Marco Spadaro



RM 2002 A 000562

Fig.9

EFFETTO IN VIVO DEL RESVERATROLO SOMMINISTRATO DOPO INFEZIONE CON VIRUS DELL'INFLUENZA PR8



P.i. di SIGMA-TAU Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A.

Dott. Marco Spadaro

